

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-009860

(43)Date of publication of application : 14.01.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C12M 3/00  
C12N 5/06  
G01N 33/53  
G01N 37/00

(21)Application number : 2001-195425

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 27.06.2001

(72)Inventor : KAWAMURA KOICHI

YAMAZAKI SUMIAKI

### (54) COMPARTMENTED CULTURE SUBSTRATE AND DNA CHIP USING THE SAME

#### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a widely applicable compartmented culture substrate capable of easily forming in high sensitivity and resolution on light exposure or heating highly hydrophilic area suitable as cell-nonadhesive area and also capable of pattern formation based on digital data by operating an infrared laser or the like, and to provide an excellent DNA chip capable of easily forming fine patterns.

**SOLUTION:** This culture substrate has the following structure: the surface of a substrate is provided with a graft layer of a high-molecular compound having functional group whose hydrophilicity/hydrophobicity change by the action of heat, acid or radiation and having a structure directly bindable via chemical bond to the substrate. This culture substrate is characterized in being obtained by irradiating a specified area of the graft layer with radiation or feeding the area with heat or acid to change the hydrophilicity/hydrophobicity of the graft layer surface to compartment the graft layer surface into cell-adhesive area and cell-nonadhesive area.

(10)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-9860

(P2003-9860A)

(43)公開日 平成15年1月14日(2003.1.14)

(51)Inventor	識別記号	P I	テレコト(参考)
C 1 2 N 15/00		C 1 2 M 3/00	4 B 0 2 4
C 1 2 M 3/00		G 0 1 N 33/63	M 4 B 0 2 9
C 1 2 N 5/06		37/00	1 0 2 4 B 0 6 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	F
37/00	1 0 2	5/00	E
			審査請求 未請求 請求項の数4 O.L. (全14項)

(21)出願番号 特願2001-195425(P2001-195425)

(22)出願日 平成13年6月27日(2001.6.27)

(71)出願人 000000201  
 富士写真フィルム株式会社  
 静岡県掛川市吉田町川尻4000番地  
 (72)発明者 川村 浩一  
 静岡県掛川市吉田町川尻4000番地 富士写  
 真フィルム株式会社内  
 (72)発明者 山崎 錠明  
 静岡県掛川市吉田町川尻4000番地 富士写  
 真フィルム株式会社内  
 (74)代理人 100079049  
 弁理士 中島 洋 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名前】 区画接着基板及びそれを用いたDNAチップ

## (57)【要約】

【詳細】 露光、加熱により高感度、高精度で、細胞の非吸着領域に好適な高親水性の領域が容易に形成でき、しかも、赤外線レーザ等を操作することによりデジタルデータに基づいたパターン形成が可能な、応用範囲の広い区画接着基板、及び、複雑なパターンを容易に形成しうる優れたDNAチップを提供する。

【解決手段】 支持体上に、熱、酸または酸剤等により親水性が変化する官能基を有し、且つ、該支持体上に直鎖状化合物により結合されうる構造を有する高分子化合物物からなるグラフト層を備え、該グラフト層の所定領域に、加熱、酸の供給または酸剤液の照射を行って、グラフト層表面の親水性を変化させ、グラフト層表面を細胞接着性領域と細胞非接着性領域に区画してなることを特徴とする。

(2)

特許2003-9860

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 支持体上に、熱、酸または輻射線により親水性が変化する官能基を有し、且つ、該支持体上に直接化学結合により結合されうる構造を有する高分子化合物からなるグラフト層を構成し、該グラフト層の所定領域に、加熱、酸の供給または輻射線の照射を行って、グラフト層表面の親水性を変化させ、グラフト層表面を細胞接着性領域と細胞非接着性領域に区別してなることを特徴とする区画培養基板。

【請求項2】 前記斜板、酸または輻射線により親水性が変化する官能基を有し、且つ、該支持体上に直接化学結合により結合されうる構造を有する高分子化合物が、高分子錠の末端で直鎖化結合により該支持体表面に結合されている直鎖状高分子化合物であるか、もしくは、高分子錠の末端で軽分子化合物を介して结构性の結合により該支持体表面に結合されている直鎖状高分子化合物であることを特徴とする請求項1に記載の区画培養基板。

【請求項3】 前記斜板、酸の供給または輻射線の照射を行った後のグラフト層表面における親水性領域が、細胞接着性領域であることと特徴とする請求項1に記載の区画培養基板。

【請求項4】 請求項1乃至請求項3に記載の区画培養基板にDNAnを固定化してなるDNAチップ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は区画培養基板に関する。特に、細胞やDNAを吸着させる領域の大きさや形状を容易に固定しうる区画培養基板及びそれを用いて得られるDNAチップに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 現在、複々の目的で細胞培養あるいは細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法も開発されている。特に細胞培養は、生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産などの目的で広く利用されており、さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生理活性や毒性を調べる試みがなされている。多くの動物細胞は、同時に接着して生存する接着生存性を有しており、このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための枠組が必要である。枠組としては、一般的には、コラーゲンやワイヤロケッキンなどの細胞接着性タンパク質が用いられ、これらを均一に塗布したプラスティック製の培養皿が用いられている。

【0003】一方、目的に応じて、培養細胞を培養上の微小な部分のみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工装置やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞を配列させる方法としては、細胞に対して接着性のちが異なるようなグラフト層がバターンをなしているような区画培養基板を用い、細胞が接

着しやすい領域を形成し、その表面だけに細胞を接着させることで、区画培養を可能とし、所望の細胞の配列パターンを形成させる方法がとられ、種々のパターン形成法が提案されている。

【0004】 例えれば、特開平2-245181号公報には、回路状に細胞培養を増殖させるなどの目的で、静電荷バターンを形成させた電荷保持媒体を細胞培養に応用している。また、特開平3-7577号公報では、細胞非接着性表面を有した細胞培養材料に紫外線や放射線を照射することによって細胞接着性の官能基を導入したり、細胞培養材料に紫外線や放射線を照射することによって垂直開始部を誘導し、この上に細胞接着性あるいは細胞接着性モノマーを重合させるなどして表面をバターニングし、これによって細胞の配列を制御する方法が提案されている。さらに、特開平3-7576号公報では、細胞非接着性あるいは細胞接着性の光感受性親水性高分子を、特開平5-176753号公報では、細胞の接着率や形態に影響を与えるコラーゲンなどの物質を、いずれもフォトリソグラフィー法によってバターニングする細胞接着用基板が暗示されている。

【0005】 このように任意の区画パターンを有する培養基板は、複々の分野に応用が可能であり、前述の生物学的現象の検査、有用な物質の生産などの他、細胞を用いた超小型バイオセンサー、スマーティング素子、ハイオリエクター、ハイブリッド型人工器器、さらにはニューロコンピューターへの応用も可能であり、さらに、近年注目されているDNAチップにも適用することができること。

【0006】 従来の一般的なパターン形成方法、例えれば、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質を吸着させて細胞接着領域を形成する場合、第1に所望のバターンを形成するのと並んで、タンパク質の接着領域と非接着領域の界面がクリアに分離し難く、第2に細胞接着性タンパク質が、細胞細胞に作用して、細胞の形態に影響を与える可能性があり、用途が限定されるといった問題を有している。また、このような細胞接着性タンパク質を用いずに、基材にフォトリソグラフィー法によるバターニングで細胞の接着領域、非接着領域を作成する場合には、細胞接着性の領域では安定性と効率の理由から、高い親水性とその持続性が求められているが、従来の親水性高分子では、開記2つの前者を満足しきるものは限られている。特に区画培養基板をDNAチップに用いる場合、500nm以下、好みとしては10~200μm程度の解像度が要求され、このような高解像度のパターン形成が可能で、且つ、高い持続性に優れた親水性領域を形成することが、精度の高い区画培養には必須の技術であるが、実用上満足するレベルのものは未だ得られていないのが現状である。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 上記従来の技術の欠点

(3)

特許 2003-9860

4

を考慮してなされた本発明の目的は、萬能或いは加熱により高感度、高解像度で、細胞の非接着領域に好適な高親水性の領域や容易に形成でき、しかも、赤外線レーザ等を操作することによりデジタルデータに基づいたパターン形成が可能な、応用範囲の広い区画培養基板及び、複雑なパターンを容易に形成しうる優れたDNAチップを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、就寝検討した結果、萬能、加熱、赤外線レーザの順序により表面の特性が変化する高分子化合物を応用することによって上記目的が達成されることを見だし本発明を実現するに至った。すなわち、本発明の区画培養基板は、支持体上に、熱、酸または粗射線により親水性が変化する官能基を有し、且つ、該支持体上に直接化学結合により結合される構造を有する高分子化合物からなるグラフト層を備え、該グラフト層の所定領域に、加熱、熱の供給または粗射線の照射を行って、グラフト層表面の親水性を変化させ、グラフト層表面を細胞接着性領域と細胞非接着性領域に区別してなることを特徴とする。

【0009】ここで、前記熱、酸または粗射線により親水性が変化する官能基を有し、且つ、該支持体上に直接化学結合により結合される構造を有する高分子化合物が、高分子鎖の末端で直接化学結合により該支持体表面に結合されている直鎖状高分子化合物であるか、もしくは、高分子鎖の末端で幹高分子化合物を介して化学的結合により該支持体表面に結合されている直鎖状高分子化合物であることが好み。本発明においては、加熱、熱の供給または粗射線の照射を行った後のグラフト層表面における親水性領域が、細胞接着領域として機能することになる。また、本発明の培養基 $\beta$ に係るDNAチップは、前記の区画培養基板にDNAを固定化してなることを特徴とする。

【0010】本発明の区画培養基板は、その表面に、熱、酸または粗射線により親水性が変化する官能基(以下、直鎖、極性変換基と称する)を有する高分子化合物の表面に極性に応じて、萬能を含む粗射線照射領域、加熱領域に選択的に親水性或いは幹水性の区画が形成されるため、基板の面積に係らず、デジタルデータに基づく萬能領域のパターン形成が可能となる。区画培養基板のグラフト層に用いられる極性変換基を有する高分子化合物は、例えば、その末端で直鎖または幹高分子化合物を介して支持体に結合しており、形成される親水性領域は高い強度と耐磨耗性を示すことになる。さらに、本発明においては、親水性/幹水性を決定する極性変換部は、運動性の高いグラフト鎖構造を有するため、公知の一般的な架橋高分子間に有する幹水性領域における分子との親和性に比較して、水分の吸着速度が極めて早く、単位面積当たりに保持する水分量が多くなり、高い親水性を発現し、先に述べたその耐久性と合わせて、

細胞非吸着領域としての機能に優れ、萬能領域の細胞の接着パターンを作成しうるという特徴を有する。

【0011】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の区画培養基板の特徴について詳細に説明する。本発明の区画培養基板の特徴である、親水性が変化する官能基を有する幹高分子鎖の末端が直接もしくは幹高分子を介して支持体表面に化学的に結合された表面を作成するための手段について説明する。

10 【表面グラフト重合】本発明に係る区画培養基板は、一般的に表面グラフト重合と呼ばれる手段をもじりて作成される。グラフト重合とは高分子化合物上に活性基を与え、これによって藍台を開始する別の藍台作をさらに重合させ、グラフト(接ぎ木)重合体を合成する方法で、特に活性基を有する高分子化合物が樹脂表面を形成する時には表面グラフト重合と呼ばれる。

【0012】本発明を実現するための表面グラフト重合法としては文部省前の公刊の方法をいずれも使用することができます。たとえば、新高分子実験学第0、高分子学会編 1994年、共立出版(株)発行、P 135には

表面グラフト重合法として光グラフト重合法、ラズマ照射グラフト重合法、が記載されている。また、既存技術、NTS(株)、竹内監修、1999、2発行、p 203、p 695には、ア媒、電子線などの放射線照射グラフト重合法が記載されている。光グラフト重合法の具体的方法としては荷開平10-296695号公報および特開平11-119413号公報に記載の方法を使用することができる。

【0013】高分子化合物鎖の末端が直接に化学的に結合された表面グラフト層を作成するための手段としてはこれらその他、高分子化合物鎖の末端にトリアルキシシリ基、イソシアネート基、アミノ基、水酸基、カルボキシル基などの反応性官能基を付与し、これと支持体表面に存在する官能基とのカップリング反応により形成することもできる。なお、本発明における支持体表面とは、その表面に、極性変換基を有する高分子化合物の末端または幹高分子化合物を介して化学的に結合する構造を有する表面を示すものであり、支持体自体がこのような表面特性を有するものであってもよく、また該支持体上に別途中间層を設け、該中间層がこのような特性を有するものであってもよい。

【0014】また、極性変換基を有する高分子化合物鎖の末端が幹高分子化合物を介して化学的に結合された表面を作成するための手段としては、支持体表面官能基とカップリング反応しうる官能基を幹高分子幹高分子の側鎖に付与し、グラフト鎖として親水性が変化する官能基を有する高分子化合物鎖を組み込んだグラフト高分子化合物を合成し、この高分子と下層表面官能基とのカップリング反応により形成することもできる。

【0015】【親水性が変化する官能基】次に、本發

50

(4)

特開2003-9860

5

明の区画検査基盤の特徴の一つである。熱、酸または構成錠により親水性が変化する官能基（活性官能基）について説明する。活性官能基としては、親水性から親水性に変化する官能基と、親水性から疎水性に変化する官能基の2種類がある。

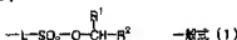
【0016】（疎水性から親水性に変化する官能基）疎水性から親水性に変化する官能基としては、文庫記載の公知の官能基を挙げることができる。これらの官能基の有用な例は、特開平10-282672号公報に記載のアルキルスルボン酸エステル、ジルホン、スルホニミド、EP0652483、WO92/9934記載のアルコキシリカルキルエステル、H. Itoら著、Macromolecules, vol.21, pp.1477記載のヒープチルエステル、その他、シリルエ斯特、ビニルエ斯特などの文献記載の数分離法で保護されたカルボン酸エ斯特などを挙げることができる。

【0017】また、角田正弘著、「表面」vol.133(1995)、pp.374記載のイミノスルホネート基、角田正弘著、Polymer preprints, Japan vol.46(1997)、pp.204記載のビクトルスルボン酸エ斯特基、山岡透夫著、特開昭63-257750のニトロベンジルスルホネート化合物も挙げることができるが、これらの官能基に開拓される訳ではない。これらのうち、特に保有しているのは下記に示される級のアルキルスルボン酸エ斯特基、3級のカルボン酸エ斯特基および下記に示されるアルコキシリカルキルエ斯特基である。

【0018】本発明において、親水性から親水性に変化する官能基として特に優れている2級のアルキルスルボン酸エ斯特基としては、下記一般式（1）で表されるものである。

【0019】

【化1】



【0020】（一般式（1）式中、 $\text{R}$ はボリマー骨格に連結するのに必要な多価の全員原子から成る荷電基を表し、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ は置換もしくは非置換アルキル基を表す。また、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ はそれが結合している2級炭素原子（ $\text{C}(\text{H})$ ）と共に環を形成してもよい。）

【0021】前記一般式（1）の $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ は置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アルキル基を表し、また、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ はそれが結合している2級炭素原子（ $\text{C}(\text{H})$ ）と共に環を形成してもよい。 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ が置換もしくは非置換アルキル基を表すとき、アルキル基としてはメチル基、エチル基、イソプロピル基、ヒープチル基、シクロヘキシル基などの直鎖状、分岐状もしくは環状のアルキル基が挙げられ、炭素数1から25までのものが好適に用いられる。 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ が置換もしくは非置換アルキル基を表すとき、アルキル基には炭素環式アリー

ル基と炭素環式アリー基が含まれる。炭素環式アリー基としてはフェニル基、ナフチル基、アントラセン基、ビレニル基など炭素数6から19のものが用いられる。また、炭素環式アリー基としてはビリジル基、フルベンゼン基、その他のベンゼン環が縮合したキノリル基、ベンゾフルベンゼン基、オキサントン基、カルバノール基などの炭素数3～20へテロ原子数1～5を含むもののが用いられる。

【0022】 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ が置換アルキル基、置換アリー基であるとき、置換基としてはメトキシ基、エトキシ基などの炭素数1～10までのアルコキシン基、フルオロ基、塩基原子などのハログン原子、トリフルオロメチル基、トリクロロメチル基のようないハログン置換されたアルキル基、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、 $\text{t}$ -ブチルオキシカルボニル基、 $\text{p}$ -ブチロフェニルオキシカルボニル基など炭素数2から15までのアルコキシンカルボニル基またはアリルオキシカルボニル基、水酸基、アセチルオキシ、ベンゾイルオキシ、 $\alpha$ -シフェニルアミノベンゾイルオキシなどのアシルオキシ基、 $\text{t}$ -ブチルオキシカルボニルオキシ基などのカルボネート基； $\text{t}$ -ブチルオキシカルボニルメチルオキシ基、 $\text{t}$ -ブチラニルオキシ基などのエーテル基；アミノ基、ジメチルアミノ基、ジフェニルアミノ基、モルフォリノ基、アセチルアミノ基などの遷移、非遷移のアミノ基；メチルチオ基、フェニルチオ基などのチオエーテル基；ビニル基、ステリル基などのアルケン基；ニトロ基、シアノ基；ホルミル基、アセカル基、ベンゾイリ基などのアン基；フェニル基、ナフチル基のようなアリー基；ビリジル基のようないヘテロアリー基等を30挙げることができる。また、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ が置換アリー基であるとき、置換基としては、前述したものの中にもメチル基、エチル基などのアルキル基を用いることができる。

【0023】上記の $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ としては、保存安定性に優れる点で、置換、非置換のアルキル基が最もよく、経時安定性の点で、アルコキシン基、カルボニル基、アルコキシンカルボニル基、シアノ基、ハログン基などの電子吸引性基で置換されたアルキル基、もしくはシクロヘキシル基、ノルボルニル基などのアルキル基が特に好みしい。

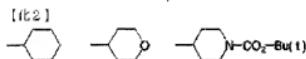
40 例題1としては、重クロロホルム中、プロトンNMRにおける2級メティレン水素のケミカルシフトが4.4 ppmよりも低磁場に現れる化合物が好みしく、4.6 ppmよりも高磁場に現れる化合物がより好みしい。このように、電子吸引性基で置換されたアルキル基が特に好みしいのは、数分離反応時に中間体として生成していると思われるカルボカチオンが電子吸引性基により不安定化し、分解が抑制されるためであると考えられる。具体的には、 $-\text{C}(\text{H})\text{R}^1\text{R}^2$ の構造としては、下記式で表される構造が特に好みしい。

【0024】

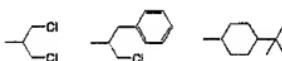
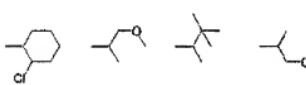
(5)

特開2003-9860

8



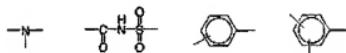
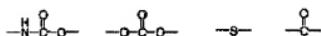
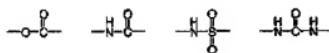
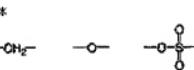
7



\*【0025】また、前記一般式(1)の如て表される非全素原子からなる多価の連結基とは、1から60個までの炭素原子、0個から10個までの窒素原子、0個から50個までの酸素原子、1箇から100個までの水素原子、及び0個から20個までの硫黄原子から成り立つものである。より具体的な連結基としては下記の構造単位が組み合わさせて構成されるものを挙げることができます。

【0026】

10 【化3】



多価ナフタレン、多価アントラセン

【0027】多価の連結基が複数基を有する場合、複数基としてはメチル基、エチル基等の炭素数1から20までのアルキル基、フェニル基、ナフチル基等の炭素数6から16までのアリール基、水酸基、カルボキシル基、スルボニアミド基、N-スルホニルアミド基、アセトキシ基のような炭素数1から6までのアシルオキシ基、メトキシ基、エトキシ基のような炭素数1から6までのアルコキシ基、塩素、臭素のようなハログン原子、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、シクロヘキシリオキシカルボニル基のような炭素数2から7までのアルコキシカルボニル基、シアノ基、 $\alpha$ -ブチルカーボネ

40 ートのような炭酸エステル基等を用いることができる。

【0028】本発明において、親水性から親水性に変化する官能基として特に優れているアルコキシアリカルエスチル基としては、下記一般式(2)で表されるものである。

【0029】

【化4】



50 【0030】式中R'は水素原子を表し、R''は水素原子

8

(2)

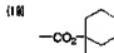
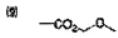
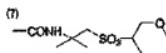
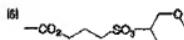
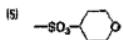
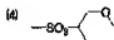
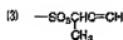
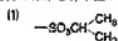
第2003-9860

3

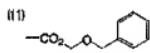
または炭素数18個以下のアルキル基を表し、R'は炭素数18個以下のアルキル基を表す。また、R'、R''およびR'''の内の2つが結合して環を形成してもよい。特に、R'およびR'''が結合して5または6員環を形成することが好ましい。

\*変化する官能基としては、一般式(1)で表される2級のアルキルスルホン酸エチル基が特に好ましい。前記一般式(1)～(2)で表される官能基【官能基(1)～(1.3)】の具体例を以下に示す。

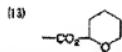
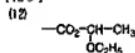
[0031]以上、本発明における防水性から親水性に



(0033)



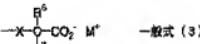
\* \* [化6]



【0034】(親水性から疎水性に変化する官能基)本発明において、熱、酸、また過硫酸鉄により親水性から疎水性に変化する官能基としては、公式的官能基、例えは、特開平1-0-2-9683号及び特許第5666190、830号に記載のオニウム塩基を含むポリマー、特にアモンニウム塩を含むポリマーを挙げることができる。具体的なものとして、(メタ)アクリロルオキシカルキルトリメチルアモンニウムなどを挙げることができる。また、下記一式(3)で示されるカルボン酸基およびカルボン酸基が疎水性ものとして挙げられるが、これらの側面に特に固定されているものはない。

100351

1603



[0036] (式中、Xは-O-、-S-、-Se-、  
 -NR'-、-CO-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-PO  
 -、-S:R' R"-、-CS-を表し、R'、R"  
 R'、R"は各々独立して1価の基を表し、Mは陽電荷を  
 表す。) 〔参考〕

R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>の具体例としては、-F, -Cl,  
-Br, -I, -CN, -R<sup>8</sup>, -OR<sup>9</sup>, -OCOR<sup>10</sup>,  
-OCOOR<sup>11</sup>, -OC(OR<sup>12</sup>)<sup>2</sup>, -OSO<sub>2</sub>  
R<sup>13</sup>, -COR<sup>14</sup>, -COOR<sup>15</sup>, -CONR<sup>16</sup>R<sup>17</sup>,  
-NR<sup>18</sup>R<sup>19</sup>, -NR<sup>19</sup>-COR<sup>20</sup>, -NR<sup>20</sup>-COO  
R<sup>21</sup>, -NR<sup>20</sup>-CONR<sup>22</sup>R<sup>23</sup>, -SR<sup>24</sup>, -SOR<sup>25</sup>,  
-SO<sub>2</sub>R<sup>26</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>27</sup>等が挙げられる。

(7)

特開2003-9860

12

R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup>は、それぞれ水素原子、アルキル基、アリー  
ル基、アルケニル基、又はアルキニル基を表す。

【0037】これらのうち、R<sup>1</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>1</sup>として  
好ましいのは、具体的には、水素原子、アルキル基、ア  
リール基、アルケニル基、アルキニル基である。Mの具本

(14)



\* 体例としては、前述のような官能基を有するイオンが挙  
げられる。前記一般式(3)で表される官能基の具体例  
〔官能基(14)～(31)〕を以下に示す。

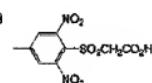
【0038】

【化8】

(15)



(16)

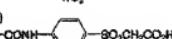


(17)

(18)

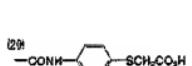


(19)

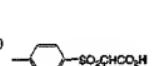


(20)

(21)

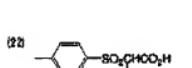


(22)



(23)

(24)

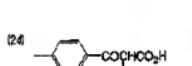


(25)



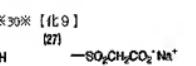
(26)

(27)



(28)

(29)



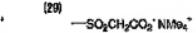
(30)

(31)



(32)

(33)



(34)

(35)



(36)

(37)



【0039】

※30%【化9】

(26)

(27)

(28)

(29)

(30)

(31)

(32)

(33)

(34)

(35)

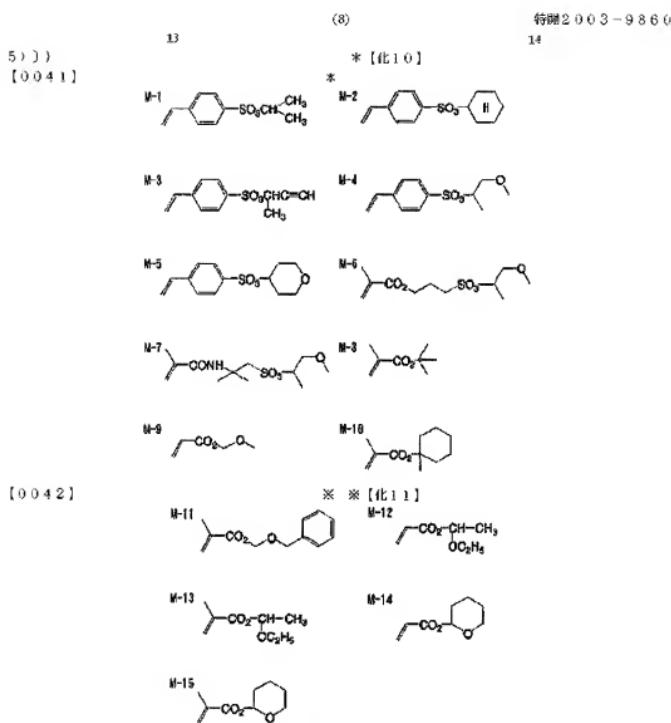
(36)

(37)

【0040】本発明における極性交換基を有する高分子  
化合物は、上記のような官能基を有するモノマー1種の  
単純化合物であっても、2種以上の共重合体であっても  
良い。また、本発明の効果を損なわない限り、他のモノ

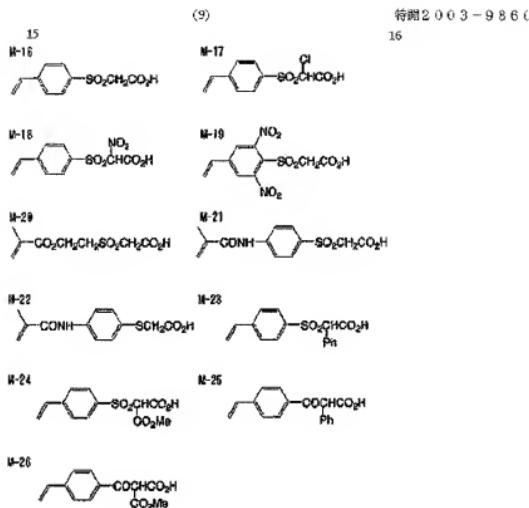
マーとの共重合体であっても良い。なお、上記のような  
官能基を有するモノマーの具体例を以下に示す。

〔前記一般式(1)～(2)で表される官能基を有する  
モノマーの具体例〔例示をノマー(M-1)～(M-1)

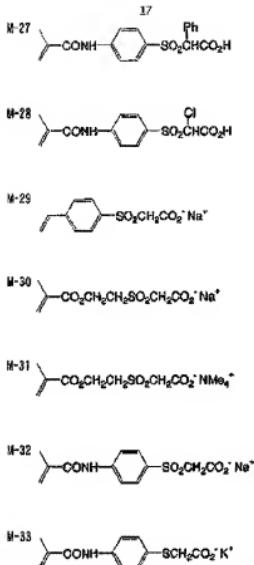


【0043】(前記一般式(3)で表される官能基を有するモノマーの具体例【例示モノマー(M-16)～(M-33)】)

【0044】  
【化12】



[0045]  
[化13]



【0046】〔支持体表面〕本発明の区画活性基板は前述の性質活性基を有する高分子化合物の末端が直鎖または高分子化合物を介して化学的に結合した繊維グリットと該高分子化合物の末端が直鎖または高分子化合物を介して化学的に結合できるような特種表面を有するものである。先に述べたように、支持体の表面自己がこのような特性を有していてもよく、このよう特種表面を有する直鎖末端を持つ支持体表面に限られてもよい。

〔0047〕《支持体表面或いは中間層》このような支持体表面は、前記表面グラフト層をグラフト台成して得けるに適した特性を有していれば、無纖維、荷機層等のいずれでもよい。また本発明においては、薄層の高分子化合物からなる凹形形成層により親水性の変化を及ぼす。

するため表面の耐性は問題ではなく、親水性であってもまた防水性であってもよい。このような中間層においては、特に、光グラフト重合法、ブリヌア重合グラフト重合法、放射線照射グラフト重合法により水溶性的薄層リマーラーを形成する場合には、有機酸素を有する層であることが好ましく、特に有機シリカの層であることが望ましい。また荷電リマーラーとしてはポキシ脂肪酸、アクリル樹脂、ウレタン樹脂、フェノール樹脂、スチレン樹脂、ビニル系樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリアミド樹

(10) 特開2003-9860

18

樹脂門、メラミン系樹脂、フォルマリン樹脂などの合成樹脂、セラミック、セラゼイン、セラロース、デンブンなどの天然樹脂のいずれも使用することができるが、光ラジカル重合法、プラズマ照射グラフト重合法、放射線樹脂グラフト重合法などではグラフト重合法の開始剤がボリマーの一水素の引き抜きから進行するため、水素が引き抜かれやすいままで、特にアクリル樹脂、ウレタン樹脂、ステレン系樹脂、ビニル系樹脂、ポリエチル樹脂、ポリアミド系樹脂、エポキシ樹脂などを使用することができます。

10 狩に飼達送の点で好ましい。このような中間層は、前述の板状（支持体）を蒙ねていても良く、また必要に応じて支持体上に設けられた中間層であってもかまわない。

【0048】また、本発明の画像形成材料においては、極性変換基を得るグラフト層の形成性、支持体との密着性の観点から、前記高分子化合物が直鎖・七化素結合している支持体として、形成されるパターンの解像度への影響を及ぼさない範囲においてその表面が粗面化されないものを利用することによって得る、前記化合物または前記複合物。

あるものをもつてこさせると、粗面化した形状をもつている場合には、その表面性状は以下の条件を満たすものであることが好ましい。粗面化された支持物の好みらしい状態としては、2次元粗さパラメータの中心線平均間隔 ( $R_g$ ) が  $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ 、最大高さ ( $R_s$ ) が  $1 \sim 10 \mu\text{m}$ 、十点平均粗さ ( $R_z$ ) が  $1 \sim 10 \mu\text{m}$ 、凸凹の平均間隔 ( $S_g$ ) が  $5 \sim 80 \mu\text{m}$ 、局所山頂の平均間隔間隔 ( $S$ ) が  $5 \sim 80 \mu\text{m}$ 、最大高さ ( $R_t$ ) が  $1 \sim 100 \mu\text{m}$ 、中心線山高さ ( $R_p$ ) が  $1 \sim 10 \mu\text{m}$ 、中心得谷深さ ( $R_v$ ) が  $1 \sim 10 \mu\text{m}$  の範囲が想われる。これらのひとつ以上の特徴を満たすものが好ましく、会をもてて商談

30 すことがより好きまし。  
【0049】(光熱交換物質) なわ、本発明の区画遮蔽基板にIRレーザーなどでパターン形成を行う場合には、該光エネルギーを熱エネルギーに変換するための光熱交換物質を区画遮蔽基板のどこかに含有させておくことが好きまし。光熱交換物質を含有させておく部分としては、例えば、鏡/穀膜性が変化するグラフト層、中間層、支持体基板のいずれでもよく、さらには、中間層と支持体基板との間に光熱交換層を設け、そこに添加してもよし。

46 [0050] 本発明の区画培養基板に用い得る光触媒变换装置としては、紫外線、可視光線、赤外線、白色光波等の光を吸収して熱に変換し物質などを作用させてできるが、発達する細胞、酵母菌、DNAなどへの影響を考え、適度に選択することが好ましい。用い得る光触媒变换剤としては、例えば、カーボンブラック、カーゴングラファイト、顕料、パラシオニアン系顕料、鐵粉、錫鉛粉、酸化鉄粉、酸化鉛、酸化銀、酸化クロム、硫化鉄、硫化クロム等が挙げられる。本発明において特に好ましいのは、書き込みに使用する赤外線レーザーの露光装置である。

(11)

特開2003-9860

20

19

料、顔料または金属塗料である。

【0051】染料としては、市販の染料及び文獻（例えば、「染料便覧」有機合成化学協会編集、昭和45年刊）に記載されている公知のものが利用できる。具体的には、アゾ染料、金属錯塩アゾ染料、ビラブランアゾ染料、アントラキノン染料、フタロシアニン染料、カルボニウム塗料、キノンイミン塗料、メチル樹脂、シアニン塗料、金属チオレート錠体等の顔料が挙げられる。好みしい染料としては、例えば、特開昭58-125246号、特開昭59-84356号、特開昭59-20282号、特開昭61-78787号等に記載されているシアニン染料、特開昭58-173696号、特開昭58-181690号、特開昭58-1945495号等に記載されているメチレン染料、特開昭58-112793号、特開昭58-224793号、特開昭59-48187号、特開昭59-73996号、特開昭60-52940号、特開昭60-63744号等に記載されているナフトキノン染料、特開昭58-112792号等に記載されているスクワリウム色素、英國特許434、875号記載のアソニン染料等を挙げることができる。

【0052】また、米国特許第5, 156, 938号記載の近赤外吸収増感剤も好適に用いられる。また、米国特許第3, 881, 924号記載の置換アリルベンゾ（オ）ビリウム塗、特開昭57-142645号（米国特許第4, 327, 169号）記載のリメチチアビリリウム塗、特開昭58-181051号、同58-220143号、同59-41363号、同59-84248号、同59-84249号、同59-146063号、同59-146061号に記載されているビリウム系化合物、特開昭59-216146号記載のシアニン色素、米国特許第4, 283, 475号に記載のペベンチメチオビリウム塗等や特開平5-13514号、同5-19702号公報に開示されているビリウム化合物も好みしく用いられる。また、好みしい別の顔料の例として、米国特許第4, 756, 993号明細書中に式（I）、（II）として記載されている近赤外吸収顔料を挙げることができる。これらの顔料のうち特に好みしいものとしては、シアニン色素、スクワリウム色素、ビリウム塗、ニッケルチオレート錠体が挙げられる。

【0053】本発明において使用される顔料としては、市販の顔料及びカラインデックス（C. I.）展観、「最新顔料便覧」（日本顔料技術協会編、1977年刊）、「最新顔料応用技術」（CMC出版、1986年刊）、「印刷インキ技術」（CMC出版、1984年刊）に記載されている顔料が利用できる。顔料の種類としては、黑色顔料、黄色顔料、オレンジ色顔料、褐色顔料、赤色顔料、紫色顔料、青色顔料、緑色顔料、光沢顔料、金属顔料、その他、ポリマー結合色素が挙げられる。具体的には、不溶性アゾ顔料、アゾレーキ顔料、塗合ア

ゾ顔料、キレートアゾ顔料、フタロシアニン系顔料、アントラキノン系顔料、ペリレン及びペリノン系顔料、チオインジコ系顔料、キナクリドン系顔料、ジオキサシン系顔料、イソインドリノン系顔料、キノフタロン系顔料、染付けレギ顔料、アジン顔料、ニロソ顔料、ニトロ顔料、天然顔料、螢光顔料、無機顔料、カーボンブラック等が使用できる。これらの顔料のうち好みしいものはカーボンブラックである。

【0054】これらの顔料又は顔料は、光熱変換物質含有量全形分の0.1～5.0重量%、好みしくは0.1～1.0重量%、顔料の場合は好みしくは0.5～1.0重量%、顔料の場合特に好みしくは0.3、1～10重量%の割合で使用することができる。顔料又は顔料の添加量が0.1重量%未満であると感度が低くなり、また5.0重量%を越えると光熱変換物質含有量の感度が弱くなる。

【0055】（支持体基板）本発明の区画培養基板に使用され、その表面に顔料特性を備えたグラフト層を有する支持体（基板）は寸度的に安定な板状物であることが好みしく、例えは、紙、プラスチック（例えは、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン等）がラミネートされた紙、金属板（例えは、アルミニウム、亜鉛、鋼等）、プラスチックフィルム（例えは、二酢酸セルロース、三酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、醋酸セルロース、酢酸酢酸セルロース、硝酸セルロース、ポリエチレンテレフタート、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリビニルアセタール等）、上記の如き金属がラミネート若しくは蒸着された紙若しくはプラスチックフィルム等が含まれる。本発明で使用される支持体としては、ポリエチルフィルム又はアルミニウム板が好みしく、その中でも、耐久下層を設けることができるポリエチルフィルムが特に好みしい。基板として使用するアルミニウム板には必要に応じて前述のような粗面化処理、階層化処理などの公知の表面処理を行なってよい。

【0056】また、他の好みしい選択であるポリエステルフィルム等のプラスチックフィルムを用いる場合にも、親/疎水性グラフト層の形成性、密着性の観点から、前述の粗面化処理を施されたものを用いることも可能なである。

【0057】なお、本発明の区画培養基板に使用される支持体が、開封中顔料を兼ねる場合は、開封中間層において詳述した樹脂材料からなるフィルムそのものを用いることができる。この場合には、顔料のうちに親/疎水性グラフト層を構成する高分子化合物の直接化学結合している支持体表面が粗面化されているものを用いることもできる。

【0058】（パターン形成方法）つぎに、このようにして得られた本発明に係る区画培養基板のパターン形成方法について説明する。本発明の区画培養基板のバター

(12)

特許 2003-9860

22

21

ン形成機構では、前記グラフト層中の高分子化合物の極性変換基が加熱、または照射線照射領域において極性変換し、親水性基は疎水性の領域が形成される。このとき、加熱、露光領域が疎水性を発現する領域となる場合、そこが細胞非接着性領域となり、非加熱領域、または未露光領域においては、疎水性層がそのままの表面状態で残存することになり、細胞接着性領域となる。また、加熱、露光領域が疎水性領域となる場合には、そこが細胞接着性領域となり、また、非加熱領域、または未露光領域においては、親水性層がそのままの表面状態で残存することになり、細胞非接着性領域となる。ここで、細胞非接着性領域における親水性の程度としては、電荷を有さず接触角が 90 度以下の親水性表面であることが好ましいが、本発明における表面疎水領域はいずれも松弛構造を示す程度の高い親水性を有するものである。

【0050】(書き込み) 本発明の画像形成材料への画像の書き込みは、光などの粗射線の照射あるいは加熱により行われる。また、光照射の一環として、前記光極変換材料を併用するタイプであれば、赤外線領域のレーザー光等の赤外光により加熱により、画像形成することも可能である。画像形成に用いる方法としては、加熱、露光等の粗射線により書き込みを行う方法が挙げられる。例えば、赤外線レーザー、紫外線ランプ、可視光線などによる光照射、マスクなどの電子線露光機、サーフェルヘッドによる熱的な記録などが可能である。これらの光源としては、例えば、水銀灯、メタルハライドランプ、キセノンランプ、ケミカルランプ、カーボンアーチ放電等がある。放電露光としては、電子線、X線、イオンビーム、速赤外線などがある。またガラス、シリコン、Deep-UV 光、高密度ヘリオビーム(レーザービーム)も使用される。一般的に用いられる具体的な構成としては、熱記録ヘッド等による直形圖像記録、赤外線レーザーによる走査露光、キセノン放電灯などの高密度フラッシュ露光や赤外線ランプ露光などが好適に挙げられる。コンピュータのデータによるダイレクト露光画像形成を行うためには、レーザー露光により極性変換を生起させる方が好ましい。レーザーとしては、炭素ガラスレーザー、速素レーザー、Ar レーザー、He/Ne レーザー、He/Cd レーザー、Kr レーザー等の気体レーザー、液体(色素)レーザー、ルビーレーザー、Nd/YAG レーザー等の固体レーザー、GaAs/GaAlAs、InGaAs レーザー等の半導体レーザー、KrF レーザー、XeCl レーザー、XeF レーザー、Ar<sub>2</sub> 等のエシジマレーザー等を使用することができる。なかでも、波長 700 ~ 1200 nm の赤外線を放射する半導体レーザー YAG レーザー等の固体高出力赤外線レーザーによる露光が好適である。

【0060】(表面グラフト重合の極性) 先に具體的に示した一般式(1)で表されるアルキルスルホン酸エステル基などの如きアミニングラフト極性変換官能基を有するグラフト層では、加熱、露光領域のみが疎水性か

ら親水性に変化し、細胞非接着領域を形成する。このようなパターン形成機構を用いる場合には、非加熱、未露光部は極性変換されず、蓋付のままの疎水性を維持し、細胞接着領域となる。効果の観点からは、非加熱、未露光領域に細胞接着性の高いカルボキシル基やアミノ基などの官能基を有することが好ましい。この細胞接着性領域は、目的に応じて、そのまま細胞を接着させ方で用いてもよく、また、細胞接着性を有するペブチド類などの高分子化合物を導入して、その後、目的とする細胞を接着させることもできる。

【0061】前記細胞接着性を有する高分子化合物の具体例としては、例えば、ポリアクリル酸、ポリビニル硫酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアリアミンなどの電荷を有する高分子化合物、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、デキストララン硫酸、ケラタン硫酸、ベララン硫酸、ヒアルロン酸、キチンなどの密着を有する多糖類、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ハイドロキセチンなどの細胞接着性タンパク質、さらには細胞接着性タンパク質や細胞接着性ペプチドを固定した高分子化合物などがあればされるが、これらに限られるものではない。

【0062】他のパターン形成機構として、例えば、特開平 10-298895 号公報に記載の「アミノニウム基などの如きカチオングラフト極性変換官能基を有するグラフト層」でもととの表面が正の電荷を有してお

り、露光或いは非加熱領域のみが電荷を消失するようになる。従って、これが細胞接着性の領域となる。

【0063】以上の方で、パターン形成された本発明の区画培養基板は、富法により細胞を培養することにより、細胞活性を容易に制御でき、露光条件によってはサブミロン (0.3 ~ 0.5 μm 程度) のオーダーまでの高解像度の微細パターンを形成することができる。このため、形成された微細パターンは、タンパク質や細胞の解析、医薬品の効果の確認などの用途のみならず、バイオセンサー、スマートチップ等、バイオリアクター、DNA チップ、人工臓器などの製造、さらにはニューロコンピューターなどの開発にも有用である。

【0064】本発明の区画培養基板は、DNA チップに有用である。DNA チップは基材表面に数 μm から数十 μm のオーダーの微細なパターンを形成し、そこに比較的小ない DNA を共有結合させて形成するもので、パターンの区画毎に複数個の印字された配列を有する異なる DNA を導入して形成されるのであり、この DNA の接着領域を前記パターン形成方法により形成するものである。DNA の吸着には、先に述べた供給結合によるものとイオン結合によるものがあるが、本発明の如き親疎水性が変化するグラフトポリマーを使用する場合には、DNA とグラフトポリマーの種類とを選択することにより、いずれの方法にも適用することができるという利点を有する。なかでも、DNA にはリン酸基が存在す

(13)

特開2003-9860

24

るため負荷を有しており、親水的なカチオングラフトと相互作用しやすいと考えられ、吸着強度の観点からも、イオン結合による吸着が有用である。本発明により得られたDNAチャップは、解像度に優れた微細なドナーを容易に形成することが可能であるため、遺伝子診断やDNAの未知の塩基配列の決定などの用途への展開が期待される。

【0065】

【実施例】以下、実施例により、本発明を詳細に説明する。

## 〔中間層帯布設〕

・エボキシ樹脂(エピコート、Yuka-shell Co.,Ltd.)	2 g
・赤外線吸収剤(IR1255 紫外線吸収剤)	0.2 g
・1-メトキシ-2-ブロバノール	9 g
・メチルエチルケトン	9 g

【0067】中間層を形成した支持体表面を次の条件下でグラフト処理して表面グラフト重合による回転基層の形成を行った。島津製作所製LCVD-01型グラフト装置を用いて0.4 wt%のアルゴンガス雰囲気下にて10秒間処理後、空気に戻し、中間層表面にペリオキシド基導入した。この値を10 wt%の(スチレン-4-スルフィニル)酢酸ナトリウム塩水溶液に浸漬し、1.5分間アルゴンガスをバブルしたのも、7時間60°Cに加熱することによってグラフト重合を行った。グラフト重合率を3000 mJ/mのイオン交換水中につけ、グラフト重合以外のホモポリマーを除去することによりグラフト処理により表面にグラフトされた表面を備えた区画培養基板原板Aを得た。

【0068】(パターン形成)得られた区画培養基板原板Aを波長830 nmの赤外光を発する赤外線レーザ(ビーム径20 μm)にて幅20 μmの複数の露光を1.30 μmの空白を隔てて基板の縦横に並び露光し、格子模様の露光パターンを形成した区画培養基板Aを得た。露光後、掩蔽剝離として牛血管内皮細胞を用い、培養方法としては、汎用の方法を用いて細胞培養を行った。区画培養基板の表面に直管内皮細胞を1×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>に調整した細胞懸濁液を塗布し、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で2~4時間培養を行ったところ、格子模様の内側の正方形のパターンの細胞接着領域(未発光部領域)のみに内皮細胞が伸展・増殖しており、所望の細胞の配列パターンが得られた。

【0069】〔実施例2〕

(パターン形成材料の作製)188 μmのコロナ処理された2種類のポリエチレンテフラーートフィルム(A4100、東洋紡《株》製)を用い、グロー処理として平版マスクロジンバッタリング装置(CFS-100-EP70、芝浦エレテック製)を使用し、下記条件で露光グロー処理を行った。

【0070】

初期真空: 9 × 10<sup>-6</sup> torr露光圧力: 6.8 × 10<sup>-2</sup> torr

\*るが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 〔実施例1〕

(区画培養基板原板の作製)188 μmのコロナ処理されたポリエチレンテフラーートフィルムを支持体として用い、その表面に下記の組成をロット10番の塗布バーを使用して塗布し、100°Cで1分乾燥し、膜厚1.6 μmの赤外線吸収剤を含有する中間層を作成した。

【0066】

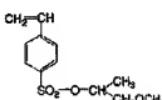
Rフロー: 1.5 kW

処理時間: 60 sec  
【0071】次に、グロー処理したフィルム上に、下記例モノマー(M-3)のメチルエチルケトン溶液(5.0 wt%)を塗布し、100°Cで1分乾燥し、UV光で照射(40 W高圧水銀灯 30分)してグラフト重合を行い、グラフト層を形成した。さらに、下記構造の光致変換色素(I-R-A)の5重量%アセトニトリル溶液をロットバー#7で塗布し、グラフト層に光致変換色素を含有させて区画培養基板原板Bを得た。

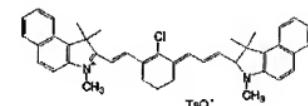
【0072】

【化14】

M-1



I-R-A



【0073】(画像形成: パターン形成)得られた区画培養基板原板Bを波長830 nmの赤外光を発する赤外線レーザ(ビーム径20 μm)にて実施例1と同様に露光し、パターン形成された区画培養基板Bを得た。露光後、区画培養基板Bを用いて実施例1と同様の細胞培養を行ったところ、細胞接着領域(未発光部領域)のみに内皮細胞が伸展・増殖しており、高光領域の

50

(14)

特開2003-9860

26

25  
固定により、所望の細胞の配列パターンが得られること  
がわかった。

【0074】

【発明の効果】本発明の区画培養基板は、露光波長は加  
熱により高感度、高解像度で、細胞の非吸着領域に好適\*

\*な高橋水性の領域が容易に形成でき、しかも、赤外線レ  
ーザ等を操作することによりデジタルデータに基づいた  
パターン形成が可能であり、応用範囲が広いという優れ  
た効果を有し、これを応用することで、微細なパターン  
形成が可能なDNAチップを得ることができる。

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 MA11  
 4B029 AA01 AA21 AA23 BB11 BB20  
 CC02  
 4B065 AA90K BC41 BC59 CA44  
 CA46